

## 와송 에틸아세테이트 분획물의 항산화 효능에 관한 연구

임은경<sup>1</sup> · 양재찬<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>목원대학교 테크노과학대학 화학·화장품학부, 석사

<sup>2</sup>목원대학교 테크노과학대학 화학·화장품학부, 교수

(2021년 1월 25일 접수; 2021년 2월 18일 수정; 2021년 2월 18일 채택)

### A Study on the Antioxidative Effect of *Orostachys Japonicus A. Berger* Ethyl Acetate Fraction

Eun Kyung Im · Jae Chan Yang<sup>†</sup>

*Mokwon University, College of Sciences & Technology, Division of Chemical & Cosmetics,  
Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 302-729 Korea*

(Received January 25, 2020; Revised February 18, 2021; Accepted February 18, 2021)

**요약** : 본 연구에서 사용된 와송(*Orostachys japonica A. Berger*)은 암 치료를 위한 민간요법으로 오랫동안 사용되어 온 약초이다. 본 연구에서는 와송(*Orostachys japonica A. Berger*) 에틸아세테이트 분획물의 항산화 효능 활성에 대하여 실험한 결과를 보고한다. 와송(*Orostachys japonica A. Berger*) 에틸아세테이트 분획물의 항산화 효능은 0.10 mg/mL 농도에서 78.54%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였고, 73.48%의 ABTS+ 라디칼 소거활성을 나타내어 항산화 효과가 있는 것을 확인하였다. 또한 대체실험동물 모델인 제브라피쉬를 이용한 독성실험 결과에서는 모든 농도에서 100%의 배아 생존율을 보이고 응고 또는 부화지연을 관찰할 수 없어 독성이 없는 것으로 나타났으며, UV-B조사에 의해 유도된 ROS생성은 와송 에틸아세테이트 분획물을 처리한 모든 larvae에서 전체적으로 형광강도가 감소하였다. 특히 3  $\mu$ g/mL 농도에서 양성대조군 대비 35.7%의 감소율을 보여 효과적으로 ROS 생성을 억제하였음을 확인하였다. 위와 같은 결과로 미루어보아, 와송 에틸아세테이트 분획물은 천연 항산화제로서 화장품 분야에서 응용 가능성이 있을 것으로 기대한다.

**주제어** : 와송, 항산화, 활성산소종, 자외선B, 제브라피쉬

**Abstract** : In this study *Orostachys japonica A. Berger* used is a medicinal herb that has long been used as a folk remedy for cancer treatment. In this study, the antioxidant efficacy of the ethyl acetate fraction of *Orostachys japonica A. Berger* was confirmed. The results of the *Orostachys japonica A. Berger* ethyl acetate fraction of antioxidant activity assays showed Antioxidant effect of *Orostachys japonica A. Berger* EtOAc fraction extract at 0.10 mg/mL was showed a DPPH radical scavenging rate of 78.54% and ABTS+ radical scavenging rate of 73.48%. Also, the toxicity result of *Orostachys*

<sup>†</sup>Corresponding author

(E-mail: rabbit@mokwon.ac.kr)

*japonica* A. Berger EtOAc fraction extracts using alternative experimental animal model zebrafish, confirmed a 100% the survival of the zebrafish embryo was shown that there was no coagulation and no hatching delay at all concentrations. also ROS generation induced by UV-B irradiation was confirmed that the fluorescence intensity decreased as a whole in all larvae treated with *Orostachys japonica* A. Berger EtOAc fraction extracts. In particular, it was confirmed that ROS generation was effectively suppressed by showing a 35.7% reduction rate compared to the positive control at a concentration of 3  $\mu\text{g/mL}$ . These results were confirmed that *Orostachys japonica* A. Berger EtOAc fraction extracts has the possibility of application in the cosmetics field as a natural antioxidant.

**Keywords :** *Orostachys japonica* A. Berger, antioxidant, reactive oxygen species, ultraviolet B(UVB), zebrafish

## 1. 서론

지속적으로 자외선에 노출된 피부는 생체 내 활성산소종 reactive oxygen species (ROS)의 과발현과 자유 라디칼(free radical) 작용으로 인해 피부 구성요소인 세포외 기질이 변성되고 깊은 주름을 형성하며 피부 탄력이 저하된다[1]. 또한 항산화 방어 체계에 심각한 불균형이 나타날 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)가 발생하여 단백질 및 DNA를 손상시켜 피부 노화를 가속화 시킴으로서 색소침착 및 피부 염증이 유도된다 [2]. 이와 같은 ROS의 과발현을 억제하기 위해서는 항산화 효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase)와 비효소적 항산화제(tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathione)로 구성된 항산화 방어망을 통해 활성 산소종의 생성과 제거 사이에 균형을 이루어 세포 기능을 유지하는 방법이 있다[3].

최근 생활용품 속 유해물질에 대한 논란이 일어나면서 소비자의 불안감이 증대됨에 따라 부작용이 없고 생리활성이 높은 천연소재를 활용한 제품을 선호하는 경향이 점차 증가하고 있으며, 약용식물에는 비타민, 무기질, 폴리페놀류와 같은 2차 대사산물이 광범위하게 포함되어 있어 미백, 주름개선, 항산화 등 효능과 안전성이 입증되었기 때문에 식품 의약품 안전처에서 다나무추출물, 감초를 미백 기능성 성분으로 고시하였다. 이외에도 다른 연구자들에 의해 사자발 쑥[4], 감잎[5], 편백잎[6], 녹차[7], 인삼[8]과 같은 약용식물을 활용한 기능성 화장품 소재개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에 활용된 와송(*Orostachys japonica* A. Berger)은 바위솔, 암송, 옥송, 작엽하초 등으로 불리는 돌나물과의 식물로 주로 여름, 가을에 뿌리까지 채취하여 햇볕에 말려 사용하며[9], 한방에서는 주로 간, 폐경에 들어가 작용하여 해열(解熱), 소종(消腫), 지혈(止血), 폐렴(肺炎) 등에 효과가 있으며[10,11], 민간에서는 열독(熱毒), 경풍(驚風), 습진(濕疹), 전염성 간염 등의 치료에 사용되어왔다[12]. 와송의 주성분으로는 triterpenoid, grutinone과  $\beta$ -sitosterol, campesterol 등의 스테롤(sterol)계열 물질, kaempferol, quercetin과 같은 플라보노이드(flavonoid)류 및 지방산에스터(fatty acid ester)는 항염 활성 및 암세포 증식을 억제하는 다양한 생리활성이 존재한다고 알려진바 있으나[13], 에틸아세테이트 분획물을 연구한 사례는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *in vivo* 수준에서 에틸아세테이트 분획물이 제브라피쉬(zebrafish)에 미치는 영향을 확인하였고 UV-B로 세포 손상을 유도하여 ROS생성 억제 작용을 확인하였다. 또한 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성을 통해 항산화 효능을 확인하여 와송 에틸아세테이트 분획물의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험기기 및 시약

추출용매로 사용한 94% 에틸알코올(ethyl

alcohol), 헥산(n-hexane), 부탄올(n-butanol), 에틸아세테이트(ethyl acetate)는 DUKSAN (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 항산화 효능 평가를 위해 사용한 시약 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl), potassium persulfate, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzo thiazoline-6-sulphonic acid)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. ascorbic acid와 DMSO (Dimethyl sulfoxide)는 DUKSAN (Korea)에서, 추출물을 희석하는데 사용한 프로필렌글리콜(propylene glycol)은 Korea Institute of Dermatological Sciences (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 기기로는 광원장치인 Nikon Intensilight C-HGFI과 광학현미경 Nikon ECLIPSE TS-100은 Nikon (USA)에서 구입하여 사용하였다. 흡광도 측정은 BioTek (USA)의 Epoch™ microplate spectrophotometer를 사용하였으며, *in-vivo* 실험동물 모델로서 제브라피쉬 사육 시스템인 reverse osmosis system과 sea salt는 Genomic-Design (Korea)사 제품을 사용하였다. 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. 자외선 조사에 사용된 UV조사 장치는 LAB24 (UV-X000, Korea)를 사용하였고, 배아 독성은 Leica S8 APO (Germany)현미경을 이용하여 관찰하였다.

## 2.2. 와송 에틸아세테이트 분획물 제조

본 실험에 사용한 와송은 대전 유성구 세동로 일대에서 채취되어 건조된 것을 제공 받아 사용하였으며 믹서로 분쇄한 후 추출에 사용하였다. 건조된 와송 300g에 70% 에탄올을 1 : 2 (v/v)의 비율로 가하여 실온에서 24h 동안 교반, 추출하였으며 5  $\mu$ m filter paper (TY2-110, ADVANTEC®, Japan)를 사용하여 aspirator (ASP-13, Iwaki Co. Ltd, Tokyo, Japan)로 감압 필터링을 진행하였다. 이 여과액을 회전식 감압 농축기(EYELA N-1110, EYELA, Korea)를 이용하여 50°C에서 농축하였으며, 농축된 추출물을 증류수에 현탁한 다음 극성이 낮은 헥산으로 비극성 성분을 제거한 후에 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 분리하였다. 분리된 에틸아세테이트층은 감압농축을 통해 용매를 완전히 제거하여 실험에 사용하였다.

## 2.3. 항산화 활성

### 2.3.1. DPPH 라디칼 scavenging activity assay

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성은 Blois의 방법을 일부 변형하여 측정하였다[14]. DMSO에 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 g/mL 농도로 용해시킨 와송 에틸아세테이트 분획물 50  $\mu$ L와 메탄올(methanol)에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액을 96-well plate에 150  $\mu$ L 분주하여 28 °C에서 30분간 반응시켰다. 이를 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 양성 대조군으로는 아스코빅에씨드(ascorbic acid)를 사용하였다.

### 2.3.2. ABTS+ 라디칼 scavenging activity assay

ABTS+ 라디칼 소거능의 경우 이호현 등 연구논문(2019)의 방법을 변형하여 실험하였다[15]. 7 mM ABTS(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.45 mM potassium persulfate를 1 : 1로 혼합하여 차광된 실온에서 24시간 동안 반응시킨 후 자유라디칼 생성을 유도하였다. 734 nm에서 ABTS 용액의 O.D. 값이  $0.70 \pm 0.02$ 가 되도록 에탄올에 희석한 다음 농도별 와송 에틸아세테이트 분획물 50  $\mu$ L과 희석된 ABTS+ 용액을 150  $\mu$ L씩 96-well plate에 처리하여 실온에서 20분 동안 반응 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 마찬가지로 양성대조군은 아스코빅에씨드를 사용하였으며 ABTS+ 라디칼 소거능은 다음과 같이 계산하여 측정하였다.

## 2.4. 제브라피쉬 사육 및 배아(embryo) 생산

제브라피쉬 성어는 질환모델링 제브라피쉬 은행(Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였으며 Genomic system의 reverse osmosis system을 이용해 수돗물을 여과한 뒤 pH 7.2~7.6의 수질과 약 2%의 염분농도를 유지하는 재순환 탱크시스템에서 사육하였다. 수온을  $28 \pm 1$  °C로 유지하면서 낮 14시간, 밤 10시간 조건을 유지하였으며 artemia (SEP-ART ARTEMIA CYSTS, USA)를 부화시켜 하루 3회 급여하였다. 배아는 암컷과 수컷을 1 : 2 비율로 산란통에 넣어 분리한 뒤 다음날 아침에 빛을 조사하여 30분 동안 산란이 이루어지도록 유도한 다음 수득하였다. 이를 미리 제조한 egg water(sea salt solution)로 충분히 세척 후 100 mm 페트리 접시(petri dish)에 50~70 마리가 되도록 배치하였으며  $28 \pm 5$  °C 항온조에 보관하여 실험에 사용하였다.

## 2.5. 와송 에틸아세테이트 분획물의 제브라피쉬(*Danio rerio*) 배아독성 평가

수정 후 6 hpf(hour-post-fertilization)경과된 제브라피쉬 배아를 24-well plate에 각 well 당 5마리씩 배치한 다음 egg water를 용매로 한 0.01% DMSO에 와송 에틸아세테이트 분획물을 1, 3, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도가 되도록 용해하여 well당 2 mL씩 처리하였다. 시료 처리 후 24시간 간격으로 배양액을 교환하고 72시간 동안 관찰하여 응고되거나 부화 지연이 일어나는 배아를 확인하였으며, 이를 바탕으로 응고율(coagulation rate, %)과 부화율(hatching rate, %)을 확인하였다. 또한, 수정 후 3 dpf (day-post-fertilization) 부화한 larvae의 심장박동을 1분 간 확인하여 와송 에틸아세테이트 분획물의 제브라피쉬 larvae에 대한 부정맥 독성평가를 측정하였다.

## 2.6. UV로 유도된 제브라피쉬에 대한 ROS 생성 저해 평가

수정 후 48 hpf에 제브라피쉬 larvae를 60 mm 페트리 접시에 5마리씩 배치한 다음 egg water를 용매로 한 0.01% DMSO에 와송 에틸아세테이트 분획물을 1, 3, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도가 되도록 용해하여 각 접시에 분주한 뒤 항온조( $28 \pm 5^\circ\text{C}$ )에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 UV 조사장치를 사용하여 UV-B ( $50 \text{ mJ/cm}^2$ )를 1분간 조사하였으며 24-well plate에 larvae를 옮겨 DCFH-DA ( $20 \mu\text{g/mL}$ )를 2 mL씩 처리 후 호일로 차광하여 항온조( $28 \pm 5^\circ\text{C}$ )에서 1시간 동안 배양하였다. 음성대조군의 경우 자외선 조사과정을 제외한 동일한 처리를 하였다. egg water로 세척 후 2% 메틸셀룰로스(methyl cellulose)에 larvae를 고정하여 형광현미경으로 형광 발현 정도를 관찰하였으며 image J (version 1.51j8, Wayne Rasband NIH, USA) 프로그램을 사용하여 이를 수치화 하였다.

## 2.7. 통계처리

본 연구의 실험은 각각 3회 실시하여 평균값으로 나타내었으며, student's t-test를 이용하여  $p < 0.05$  유의수준에서 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

## 3.1. 와송 에틸아세테이트 분획물의 항산화 활성 평가 결과

### 3.1.1. DPPH 라디칼 scavenging activity assay

와송 에틸아세테이트 분획물의 전자공여능은 DPPH 라디칼 소거활성법을 이용하여 측정하였다. DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 자유라디칼이며 물질의 항산화 활성을 분석하는데 널리 이용되는 실험방법으로 페놀성 화합물과 같은 수소에 전자를 공여하는 전자공여체와 반응하게 되었을 때 안정한 분자를 나타낸다[16,17]. 본 연구에서는 와송 에틸아세테이트 분획물을 0.01, 0.03, 0.05, 0.10 mg/mL농도로 용해하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 0.01 mg/mL 농도에서는 12.21%의 미비한 라디칼 소거활성을 나타내었으며 0.03, 0.05, 0.10 mg/mL 농도에서는 각각 33.32, 50.96, 78.54%의 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid에서는 0.10 mg/mL에서 93.64%의 소거능을 나타내었음을 확인하였다(Fig. 1). 추출 용매 및 방법에 따른 와송 에틸아세테이트 분획물의 DPPH 라디칼 소거능을 비교해 볼 때 98% 메탄올을 용매로 추출하여 분획한 Kim(2017) 등의 연구에서는 0.25, 0.50 mg/mL농도에서 각각 48.27, 88.84%의 소거활성을 보였으며[18], 80% 에탄올을 이용하여 환류 냉각조건에서 추출하여 분획한 Park(2017) 등은 100  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 약 20.00% 이하의 라디칼 소거 활성을 나타내었고 1000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 91.79%의 라디칼 소

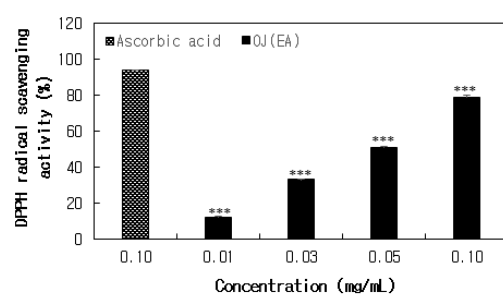


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity(%) of OJ(EA). Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate.

\*\*\* :  $p < 0.005$ .

거 활성을 나타내었다[19]. 이와 같이 추출용매 및 방법에 따라 와송 에틸아세테이트 분획물의 라디칼 소거활성에 차이가 있음을 확인하였으며 이에 따라 저해 활성을 나타내는 물질들의 용출에도 차이가 있을 것으로 사료된다.

### 3.1.2. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 scavenging activity assay

ABTS<sup>+</sup> 라디칼 scavenging activity 측정은 강력한 산화물질인 potassium persulfate에 의해 생성되며 짙은 청록색을 띠는 ABTS<sup>+</sup>가 hydrogen-donating antioxidant에 의해 환원되었을 때 라디칼이 소거되어 투명색(ABTS<sup>+</sup> neutral form)을 나타내는 원리를 이용한 방법이다[20]. DPPH 라디칼 scavenging activity assay와 마찬가지로 ABTS는 인위적인 라디칼을 제거하는 작용 기작을 나타내어 DPPH 라디칼 소거활성과 유의적 상관성을 나타내는 것으로 알려져 있으나[21], DPPH는 자유 라디칼이며, ABTS는 양이온 라디칼(cation radical)로 항산화물질에 따라 라디칼을 제거하는 차이가 있다[17].

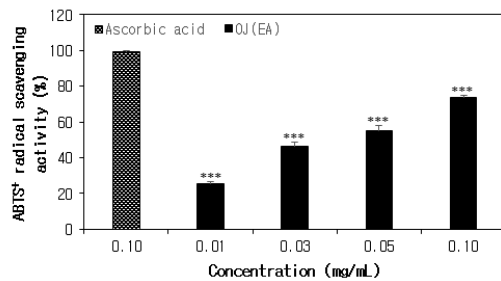


Fig. 2. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity(%) of OJ(EA) was measured an absorbance at 734 nm. Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate. \*\*\* :  $p < 0.005$ .

와송 에틸아세테이트 분획물의 항산화 효능을 확인하기 위해 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거활성을 측정된 결과(Fig. 2) 0.01, 0.03, 0.05, 0.10 mg/mL농도에서 각각 25.44, 46.19, 55.20, 73.48%의 라디칼 소거능을 확인하였다. 이는 양성대조군인 아스코빅에씨드(99.56%) 보다 낮은 활성을 나타내었으나 0.05 mg/mL에서 50.0%이상의 라디칼 소거활성을 보였으며 200  $\mu$ g/mL 농도의 와송 에틸아세테이트 분획물에서 69.04%의 라디칼 소거활

성을 나타낸 Park(2017) 등의 연구와 비교해볼 때 상대적으로 본 연구에서 사용된 와송 에틸아세테이트 분획물의 항산화 활성이 우수함을 확인할 수 있었다[19].

### 3.2. 와송 에틸아세테이트 분획물의

#### 제브라피쉬(*Danio rerio*)독성 평가

본 실험에서는 제브라피쉬에서 와송 에틸아세테이트 분획물에 대한 독성평가를 위해 DMSO에 1 mg/mL 농도로 용해하여 원액(stock solution)을 제조한 뒤 이를 egg water에 희석하여 최종농도가 1, 3, 5, 10  $\mu$ g/mL이 되도록 하여 실험에 사용하였다. 용해한 와송 에틸아세테이트 분획물을 배아에 처리 후 72시간 동안 응고율 및 부화율을 확인하였으며(Fig. 3), 3 dpf에 제브라피쉬 larvae의 심장박동에 미치는 영향을 1분간 측정하였다(Fig. 4). 먼저 와송 에틸아세테이트 분획물을 처리한 배아의 응고는 24, 48, 72시간 동안 대조군을 포함한 모든 농도에서 발생하지 않았으며 (data not shown), 부화율에서는 48시간 경과 후 모든 농도에서 80% 이상의 부화율을 나타내었다. 또한 72시간 경과 후 대조군을 포함한 모든 농도에서 100% 부화되었음을 관찰하여 와송 에틸아세테이트 분획물에 의한 제브라피쉬에서 부화 지연이 나타나지 않음을 확인하였다.

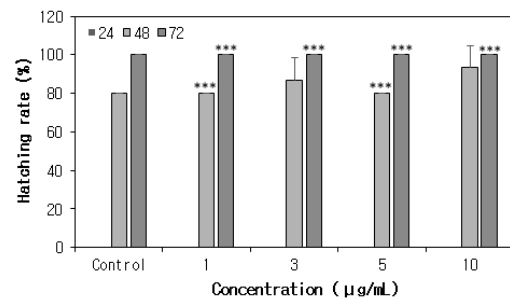


Fig. 3. Hatching rate were measured after treatment with various concentrations of OJ(EA) at zebrafish for 72 hours. Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate. \*\*\* :  $p < 0.005$ .

제브라피쉬는 발생 하루 만에 심장이 형성되어 박동이 시작되며 혈관 내 혈액세포의 흐름을 관찰할 수 있다. 제브라피쉬의 심장은 인간의 심장

과 마찬가지로 전기적 자극(electrical excitation)이 동일한 양상을 나타내며 부정맥은 심장박동이 정상적이지 못하거나 심실과 심방에서의 전기적 자극의 부정확한 전도 또는 심장박동의 자동성 장애로 인해 발생한다[22]. 와송 에틸아세테이트 추출물이 제브라피쉬의 심장박동에 미치는 영향을 알아보고자 3 dpf에 심장박동을 1분간 측정할 결과 1, 3, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 137.4, 136.0, 133.9, 133.6 회/1 min를 나타내었다. 이는 대조군(egg water: 135.1회)과 비교하였을 때 유의미한 차이를 보이며 위와 같은 결과를 종합하였을 때 와송 에틸아세테이트 분획물은 제브라피쉬의 심장박동에 영향을 주지 않으며 제브라피쉬에 나타나는 독성 또한 미미한 것으로 판단되었다.

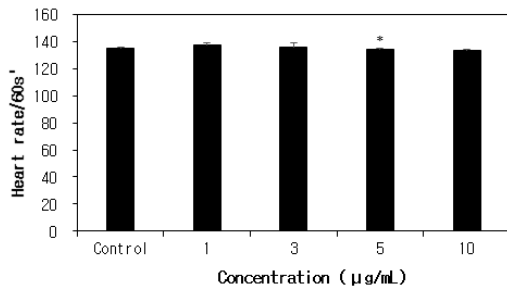


Fig. 4. Arrhythmia test of OJ(EA) on zebrafish larvae. Counting the heartbeat of zebrafish larvae after treated OJ(EA) for 1 min. Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiment performed in duplicate. \* :  $p < 0.05$ .

### 3.3. UVB로 유도된 제브라피쉬에 대한 ROS생성 저해 평가

본 실험에서는 와송 에틸아세테이트 분획물을 처리하였을 때 UV-B로 유도된 제브라피쉬 larvae의 ROS 생성에 대한 저해율을 평가하기 위해 DCFH-DA처리를 통한 형광발현 정도를 측정하였다. DCFH-DA는 세포막을 통과하여 확산하며 ROS 존재 시 세포 내 가수분해 효소인 esterase에 의해 DCFH가 가수분해되어 DCF가 형성되고 형광이 발현된다[23].

와송 에틸아세테이트 분획물을 1시간 동안 처리하여 UV-B로 유도된 제브라피쉬 larvae의 ROS 생성 결과는 1, 3, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  농도에서

각각 90.7, 90.4, 95.8, 97.0%로 UV-B를 조사한 대조군(126.1%)과 비교하였을 때 와송 에틸아세테이트 분획물을 처리한 larvae에서 전체적으로 형광강도가 감소하는 것을 확인하였으며 특히 3  $\mu\text{g/mL}$ 이하 농도에서 UV-B를 유도하지 않은 대조군(100.0%)보다 현저히 낮았다(Fig. 5). 이와 같은 결과로 보아 와송 에틸아세테이트 분획물은 제브라피쉬에서 UV-B로 인해 증가한 ROS 생성을 저해하는 효과가 모든 농도에서 우수한 것으로 확인되었다.

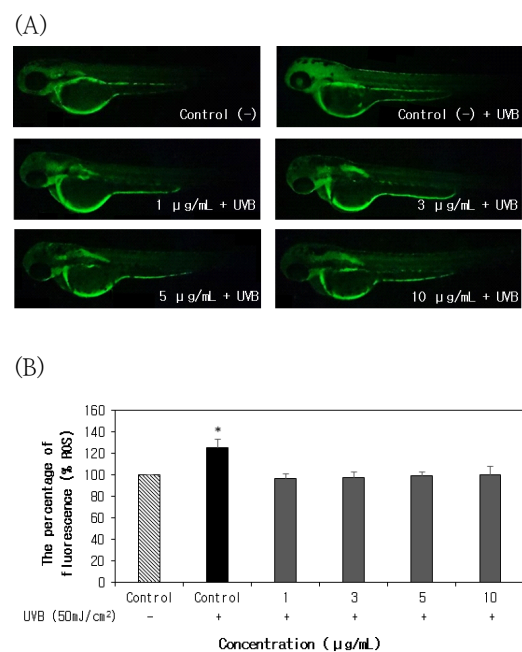


Fig. 5. Effect of OJ(EA) under UV-B irradiation on zebrafish larvae. (A): Intra zebrafish larvae antioxidant activity of OJ(EA) under various concentrations. Control(Egg water). (B): Intra zebrafish larvae ROS levels generated by UV-B(50  $\text{mJ/cm}^2$ ) radiation for 1 min. ROS levels were detected using a fluorometer microscope after staining with DCFH-DA(20  $\mu\text{g/mL}$ ). Data are shown as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate. \* :  $p < 0.05$ .

#### 4. 결론

와송 에틸아세테이트 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성과 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 측정 한 결과, 농도 의존적으로 항산화 효능이 증가하는 것을 확인하였으며 대체실험 동물모델인 제브라 피쉬를 이용한 독성평가에서는 10  $\mu\text{g/mL}$  이하의 농도에서 응고 또는 부화 지연이 발생하지 않았다. larvae의 심장박동에도 대조군과의 큰 차이를 보이지 않아 와송 에틸아세테이트 분획물 처리가 제브라피쉬의 발생에 있어 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였으며, 분획물을 처리하였을 때 제브라피쉬에 대한 UV-B로 유도된 ROS 생성을 유의적으로 억제하였다. 특히 3  $\mu\text{g/mL}$  이하 농도에서 UV-B를 조사하지 않은 대조군보다 낮은 ROS 생성량을 보여 와송 에틸아세테이트 분획물의 UV-B 유도에 의한 ROS 생성 억제 효과가 우수한 것을 확인하였다. 이상의 결과로부터 와송 에틸아세테이트 분획물은 추후 천연 항산화제, 보존제로서 화장품 분야에서 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

#### References

1. M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poo' r, L. Naderi, et al. "Solar UV irradiation and dermal photoaging", *Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 63, pp. 41-51, (2001).
2. S. M. Jeon, "Antioxidative components of *Suaeda asparagoides* and its application to cosmetics", *Seoul National University of Technology*, pp. 14, (2008).
3. J. R. Jang, S. Y. Hwang, S. Y. Lim, "Effects of Extracts from Dried Yam on Antioxidant and Growth of Human Cancer Cell Lines", *Journal of Life Science*, Vol. 20, No. 9, pp. 1365-1372, (2010).
4. H. G. Yang, H. J. Kim, H. S. Kim, S. N. Park, "Original article : Ethosome Formulation for Enhanced Transdermal Delivery of *Artemisia princeps Pampanini* Extracts", *Applied Chemistry for Engineering*, Vol. 24, No. 2, pp. 190-195, (2013).
5. J. H. Shim, S. Y. Park, "Anti-aging Effects of *Diospyros kaki Thunb.* Extracts in UVA-irradiated Epidermal Keratinocytes", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol. 15, No. 2, pp. 170-178, (2017).
6. M. S. Lim, D. S. Lee, S. S. Kwon, S. N. Park, "Research Papers : Stability Test for the Cream Containing *Chamaecyparis Obtusa Leaf* Extract", *Journal of the Korean Oil Chemists Society*, Vol. 29, No. 2, pp. 205-213, (2012).
7. B. G. Lee, "Skin Care Effects of *Green Tea*", *Journal of the society of cosmetic scientists of korea*, Vol. 31, No. 4, pp. 311-321, (2005).
8. S. N. Park, S. K. Han, "Extraction, Component Analysis and Antibacterial Activity of *Panax ginseng* Absolute Essential Oil", *Journal of the society of cosmetic scientists of korea*, Vol. 34, No. 1, pp. 67-73, (2008).
9. D. S. Kim, "Natural Healing Revolution: Immunity-enhancing Cancer Treatment Method of Rural Oriental Doctor Kim Dong-Seok", Sangsang Publishing, (2011).
10. S. H. Jeon, D. O. Hong, C. W. Lee, H. Y. Kim, S. C. Shin J. H. Kang, "Growth and flowering of *Orostachys japonicus A. Berger* affected by transplanted seedling size", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol. 14, No. 3, pp. 153-157, (2006).
11. J. Kwon, S. H. Kwang, "Effect of *Orostachys japonicus A. Berger* on the Immune system". *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol. 12, No. 4, pp. 315-320, (2004).
12. S. Y. Yoon, S. Y. Lee, K. B. W. R. Kim, E. J. Song, S. J. Kim, S. J. Lee, C. J. Lee, D. H. Ahn, "Antimicrobial Activity of the Solvent Extract from Different Parts of *Orostachys japonicus*", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 38, No. 1, pp. 14-18, (2009).

13. S. Y. Choi, "Inhibitory Effects of *Orostachys japonicus* Extracts on the Formation of N-Nitrosodimethylamine", Dissertation, University of Gyeongsang, (2006).
14. P. Molyneux, "The use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for Estimating Antioxidant Activity", *Journal of Science and Technology*, Vol. 26, No. 2, pp. 211-219, (2004).
15. H. H. Lee, Y. S. Moon, "Assessment of the Important Factors Influencing Consistent and Accurate ABTS Assay", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 48, No. 3, pp. 390-394, (2019).
16. S. I. Kim, D. G. Kim, J. B. Park, T. K. Lee, "DPPH Radical Scavenging, and Tyrosinase Inhibitory Activities of *Ecklonia cava* Extracted with the Ultrasonic Wave Method", *Journal of Life Science*, Vol. 23, No. 7, pp. 913-918, (2013).
17. B. G. Lee, J. H. Kim, S. G. Ham, C. E. Lee, "Study on Biological Activities of Extracts for Cosmeceutical Development from *Lagerstroemia indica* L. Branch", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol. 27, No. 1, pp. 29-34, (2014).
18. S. M. Kim, J. H. Park, H. O. Boo, S. G. Song, H. Y. Park, "In vitro Comparison of Biological Activities of Solvent Fraction Extracts from *Orostachys japonicus*", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol. 30, No. 2, pp. 133-143, (2017).
19. S. B. Park, D. S. Lee, J. Y. Kang, J. M. Kim, S. K. Park, J. E. Kang, B. S. Kwon, S. H. Park, C. J. Lee, U. Lee, H. J. Heo, "Protective effect on neuronal cells of *Orostachys japonicus* A. Berger extract against reactive oxygen species-induced neuronal cytotoxicity and active compounds", *Korean Society of Food Science and Technology*, Vol. 49, No. 5, pp. 524-531, (2017).
20. Ho-Hyeon Lee, Yong-Sun Moon, "Assessment of the Important Factors Influencing Consistent and Accurate ABTS Assay", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 48, No. 3, pp. 390-393, (2019).
21. Y. M. Lee, J. H. Bae, H. Y. Jung, J. H. Kim, D. S. Park, "Antioxidant Activity in Water and Methanol Extracts from Korean Edible Wild Plants", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 40, No. 1, pp. 29-36, (2011).
22. P. Nemtsas, E. Wettwer, T. Christ, G. Weidinger, U. Ravens, "Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 48, pp. 161-171, (2010).
23. M. J. Kim, E. J. Park, "Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 40, No. 7, pp. 1053-1062, (2011).